

GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE GRÃOS DE PÓLEN DE *PRUNUS PERSICA* (L.) *BATSCH VULGARIS*

IN VITRO GERMINATION OF GRAINS POLLEN OF Prunus persica (L.) *BATSCH vulgaris*

**Edvan Alves CHAGAS¹; Wilson BARBOSA²; Rafael PIO³;
Fernando Antonio Campo DALL'ORTO¹; Leandro Henrique Gulielmin TIZATO⁴;
Angela SAITO⁵; Pollyana Cardoso CHAGAS⁶; João Alexio SCARPARE FILHO⁷**

1. Pesquisador Científico do Centro APTA Frutas, Instituto Agrônomo-IAC, Jundiaí, SP, Brasil. echagas@iac.sp.gov.br.
2. Pesquisador Científico do IAC, Centro Experimental Central, Campinas, SP; 3. Professor Adjunto de Fruticultura, Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE; 4. Estagiário do Centro APTA Frutas/IAC, Bolsista de I. C., FAPESP;
5. Estagiário do Centro APTA Frutas/IAC., Bolsista de I. C./CNPq; 6. Engenheiro Agrônomo, Mestrando do Curso de Fitotecnia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ, Universidade de São Paulo - USP, Bolsista FAPESP.;
7. Professor Titular de Fruticultura do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ - USP, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

RESUMO: Objetivou-se ajustar um protocolo para a germinação *in vitro* de grãos de pólen de pessegueiro. Para tal, foram realizados cinco experimentos com a finalidade de se estabelecer a concentração ideal de sacarose, ágar, nitrato de cálcio, ácido bórico, o melhor valor de pH, a temperatura para germinação de grãos de pólen e o tempo de início de emissão do tubo polínico. Como material vegetal utilizou-se as cultivares Aurora 1 e Douradão. Para a cultivar Aurora 1, a maior germinação de grãos de pólen foi obtida com a utilização de 48,29 g.L⁻¹ de sacarose, 10 g.L⁻¹ de ágar, 400 mg.L⁻¹ de ácido bórico e pH de 5,5. Para a cultivar Douradão, a maior germinação de grão de pólen foi obtida em meio contendo 90 g.L⁻¹ de sacarose, 10 g.L⁻¹ de ágar, 400 mg.L⁻¹ de ácido bórico, 369 mg.L⁻¹ de nitrato de cálcio no meio de cultura e pH 6,5. A melhor temperatura para germinação de grãos de pólen para ambas as cultivares foi 25°C, sendo que a porcentagem de germinação de grãos de pólen aumentou diretamente proporcional ao tempo de avaliação.

PALAVRAS-CHAVE: Palinologia. Pessegueiro. Cultura de tecidos. Meio de cultura. Reagentes.

INTRODUÇÃO

Uma das técnicas utilizadas na obtenção de novas variedades de pêssigo tem sido a hibridação controlada no campo com posterior avaliação das progênies. Entretanto para se obter sucesso nos cruzamentos é importante que se detecte antes de ir para o campo a viabilidade do pólen de espécies de plantas frutíferas. Para tal, várias técnicas podem ser utilizadas (GALLETA, 1983), sendo que as mais utilizadas são aquelas *in vitro*, a exemplo da gota pendente (SCORZA; SHERMAN, 1995) e os meios com ágar (EINHARDT et al., 2006). Assim vários estudos têm sido conduzidos no sentido de determinar qualitativa e quantitativamente os componentes necessários para a melhor composição do meio de cultura para a germinação de grãos de pólen (BARBOSA et al., 1991; NUNES et al., 2001; PIO, 2003).

A sacarose utilizada no meio de cultura proporciona o equilíbrio osmótico entre o pólen e o meio de germinação, além de fornecer energia para auxiliar o processo de desenvolvimento do tubo polínico (STANLEY; LINSKENS, 1974). O ágar é utilizado para solidificação do meio de cultura. Com relação à concentração, as respostas na germinação de grãos de pólen variam de acordo com a espécie

de frutífera. Algumas espécies germinam melhor em meio com maior concentração de ágar (FREITAS et al., 2006b), enquanto outras, necessitam de quantidades menores (CHAGAS et al., 2006a).

O emprego de cálcio e boro no meio de cultura é importante para promover a germinação e alongamento do tubo polínico (KWACK; BREWBAKER, 1963; SAHAR; SPIEGEL, 1980). Entretanto, em nespereira (CAVALLARI et al., 2006) e pereira (FREITAS et al., 2006a) constatou-se que o requerimento de cálcio e boro depende da variedade utilizada.

O pH é também fator importante do meio de cultura. Além de influenciar na disponibilidade de nutrientes e fitorreguladores, o pH interfere no grau de solidificação do ágar (PASQUAL et al., 2002).

Outros fatores de grande relevância que influenciam significativamente na germinação dos grãos de pólen são, a temperatura e o tempo necessário para sua germinação. O conhecimento do início da emissão do tubo polínico e de sua estabilização em trabalhos de palinologia é de grande importância, pois permite determinar o tempo ideal para avaliação dos testes de viabilidade após a inoculação o que proporciona melhor qualidade das polinizações controladas.

Neste contexto, objetivou-se ajustar um protocolo para a germinação *in vitro* dos grãos de pólen de pessegueiro cultivares Aurora 1 e Douradão.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas anteras retiradas de flores em estágio “balão” das cultivares Aurora 1 e Douradão, e colocadas em placas de Petri com papel de filtro e mantidas à temperatura de 26°C, durante 12 horas, para a completa deiscência e liberação de grãos de pólen. O políneo (massa viscosa de grãos de pólen fortemente aderidos) foi utilizado para a instalação dos seguintes experimentos: 1) concentrações de sacarose (0, 30, 60 e 90 g.L⁻¹) e agar (4, 6, 8 e 10 g.L⁻¹); 2) concentrações de nitrato de cálcio (0, 200, 400 e 800 mg.L⁻¹) e ácido bórico (0, 400, 800 e 1200 mg.L⁻¹); 3) valores de pH (4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5); 4) temperaturas (20; 25; 30 e 35) e; 5) tempo de emissão do tubo polínico (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 12 horas após a inoculação).

Para cada experimento, 20 ml de meio de cultura, constituído pelos diferentes tratamentos de acordo com cada experimento, foram vertidos em placas de Petri. Após solidificado, os polínios de cada variedade foram distribuídos sobre a superfície do meio com auxílio de um pincel, de modo a promover distribuição homogênea. As culturas foram mantidas a 27°C e fotoperíodo de 24 horas, com exceção do experimento de diferentes temperaturas. Com auxílio de lupa binocular com objetiva de 10 X, avaliou-se a porcentagem de grãos de pólen germinados, após 24 horas de

incubação, com exceção do experimento cinco (tempo de emissão do tubo polínico), que foi avaliado em intervalos pré-estabelecidos. Foram considerados germinados os grãos de pólen cujo comprimento do tubo polínico tivesse o dobro do seu próprio diâmetro.

Em todos os experimentos, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial de acordo com cada experimento para se estudar as interações entre os fatores testados, com quatro repetições e 100 grãos de pólen por parcela. Os dados foram submetidos à análise de variância, as médias comparadas pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade e os dados quantitativos submetidos a regressão. As análises foram realizadas pelo Programa Computacional Sistema para Análise de Variância - SISVAR (FERREIRA, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Concentrações de agar e sacarose

Para a variedade Aurora 1, maior germinação de grãos de pólen (55,42%) foi obtido utilizando-se a concentração de 48,29 g.L⁻¹ de sacarose combinado com 10 g.L⁻¹ de agar (Figura 1A). Resultado semelhante também foi observado utilizando-se 90 g.L⁻¹ de sacarose e 6 g.L⁻¹. Chagas et al. (2007), estudando a germinação *in vitro* de grãos de pólen de pereiras, verificaram que a concentração de 10 g.L⁻¹ de agar combinada com 47,78 g.L⁻¹ para proporcionaram os melhores resultados para a pereira ‘Taiwan Nashi-C’.

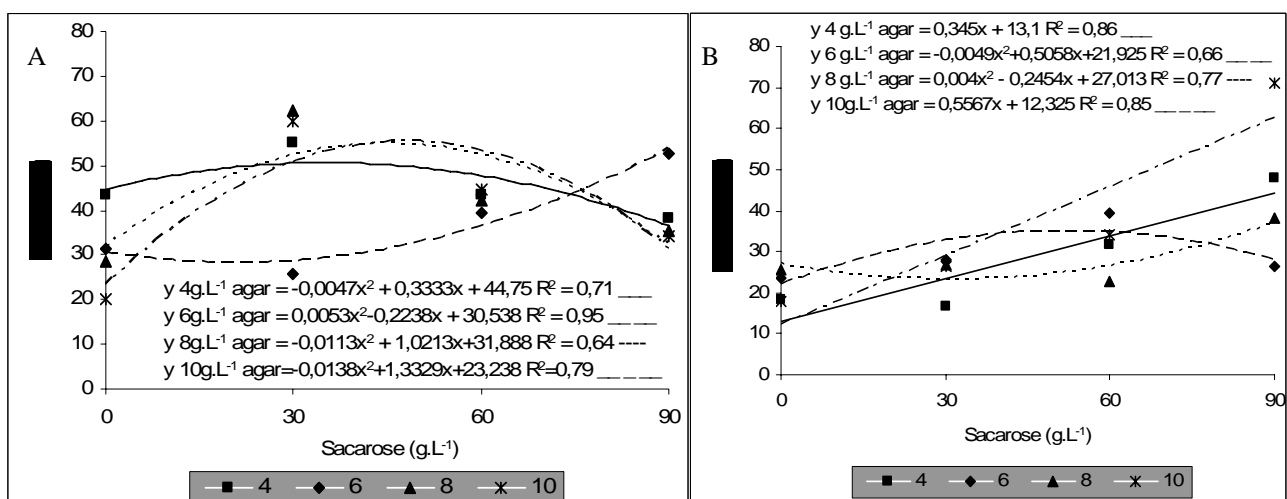


Figura 1. Porcentagem de grãos de pólen germinados *in vitro* de pessegueiro ‘Aurora 1’ (1A) e ‘Douradão’ (1B) quando submetidas a diferentes concentrações de agar e sacarose.

Para a variedade Douradão, melhor resultado (71% de germinação) foi obtido com 90 g.L⁻¹ de sacarose combinado com 10 g.L⁻¹ de agar. Resultado semelhante foi obtido na germinação de grãos de pólen de porta-enxerto de pereira ‘Taiwan Mamenashi’ (CHAGAS et al., 2007). A dose de 90 g.L⁻¹ de desse carboidrato também proporcionou bons resultados quando combinado com 4 e 8 g.L⁻¹ de agar. Por outro lado, a utilização de 6 g.L⁻¹ de agar proporcionou a menor porcentagem de germinação de grãos de pólen para todas as doses de sacarose testadas (Figura 1B).

Concentrações de nitrato de cálcio e ácido bórico

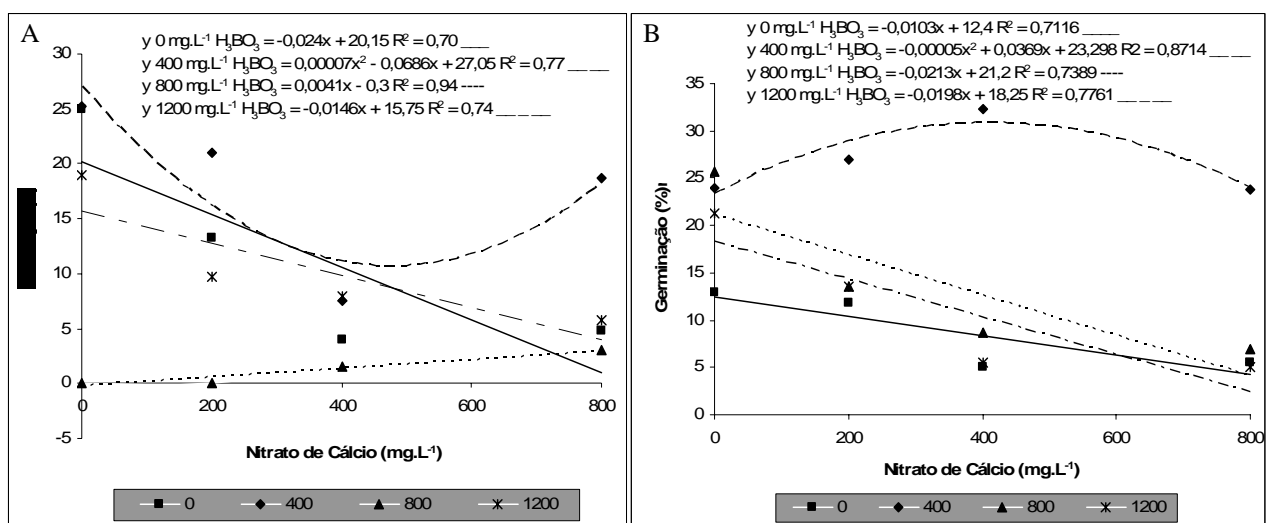


Figura 2. Porcentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen de pessegueiro variedade Aurora 1 (1A) e Douradão (1B) quando submetidas a diferentes concentrações de nitrato de cálcio e ácido bórico.

Para a cultivar Douradão verificou-se efeito semelhante. Exceto para a concentração de 400 mg.L⁻¹ de ácido bórico que, quando combinado com 369 mg.L⁻¹ de nitrato de cálcio proporcionou o melhor resultado na germinação *in vitro* de grãos de pólen (Figura 2B). Para todas as demais concentrações de ácido bórico testadas, houve um decréscimo na porcentagem de germinação a medida em que se elevava a concentração de nitrato de cálcio no meio de cultura (Figura 2B).

Ajuste do pH

Verifica-se através da Figura 3 que houve um efeito positivo do pH na germinação *in vitro* das cultivares de pessegueiro testadas. Para variedade Douradão, observou-se aumento na porcentagem de grãos de pólen germinado a medida em que se eleva o valor de pH, até o valor máximo testado (6,5).

Verificou-se, de maneira em geral, que a adição de nitrato de cálcio afetou significativamente a germinação *in vitro* de grãos de pólen da cultivar Aurora 1, sendo que os melhores resultados foram observados na sua ausência. Para esta cultivar maior porcentagem de germinação foi constatada quando adicionou-se 400 mg.L⁻¹ de ácido bórico na ausência de nitrato de cálcio (Figura 2A). Resultado semelhante foi observado para a germinação *in vitro* de grãos de pólen de pereira onde constataram que não há necessidade da adição desse reagente para a germinação *in vitro* de grãos de pólen dos porta-enxertos ‘Taiwan Mamenashi’ e ‘Taiwan Nashi-C’ (CHAGAS et al., 2007).

Para a variedade Aurora 1, o melhor ajuste de pH foi de 5,5. Valores abaixo e acima desses pH proporcionaram menores taxas de germinação. HE et al. (2005), também verificaram ao estudar a viabilidade de grãos de pólen de várias espécies de *Prunus* que o melhor pH situou-se próximo de 5,8.

Segundo Pierik (1987) o pH que proporciona um crescimento adequado da maioria das espécies, situa-se na faixa de 5 a 6,5. Valores acima desses podem ocasionar uma paralisação do crescimento e desenvolvimento *in vitro* (MURASHIGE, 1974). Chagas et al. (2006b), observaram que o melhor ajuste de pH no meio de cultura para germinação *in vitro* de grãos de pólen de nectarineiras foi de 6,5. No presente trabalho, de modo geral, constatou-se que valores de pH entre 5,5 e 6,5 foram os que proporcionaram as maiores taxas de germinação para ambas as variedades.

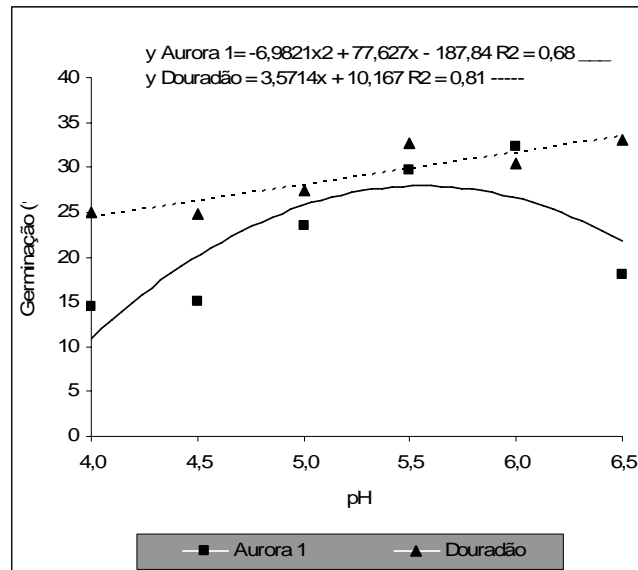


Figura 3. Porcentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen germinados de pessegueiro ‘Aurora 1’ e ‘Douradão’ quando submetidos a diferentes valores de pH.

Temperatura

Para as cultivares Aurora 1 e Douradão, as melhores temperaturas para germinação de grãos de pólen foram aquelas situadas entre 20 e 30°C, as quais não diferiram entre si. Para as cultivares Aurora 1 e Douradão, as maiores porcentagens de germinação (62 e 48%) foram obtidas quando o

pólen foi colocado para germinar em B.O.D. com 25°C, respectivamente. Entretanto, essa diferença não foi comprovada estatisticamente (Tabela 1). Este resultado está de acordo com os obtidos por DU et al. (2006). Estes autores verificaram que a melhor temperatura para germinação *in vitro* de grãos de pólen de *Prunus mume* foi a de 25°C.

Tabela 1. Porcentagem de grãos de pólen de pessegueiro ‘Aurora 1’ e ‘Douradão’ germinados *in vitro* em função de diferentes temperaturas.

Temperaturas °C	Cultivares	
	Aurora 1	Douradão
	Porcentagem de Germinação	
20	48,25abAB	27,50 abB
25	62,00aA	48,00aAB
30	45,25abA	40,25 aA
35	31,75bA	16,75 bAB

* Médias seguidas da mesma letra em minúscula na coluna e maiúsculo na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A temperatura de 35°C não foi adequada para a germinação dos grãos de pólen das duas cultivares testadas, proporcionando os menores percentuais de germinação (Tabela 1).

Weinbaum et al. (1984), estudando o efeito da temperatura em várias espécies de *Prunus*, verificaram que a máxima germinação de grãos de pólen ocorreu quando os polens foram postos a germinar em ambientes com temperaturas entre 16 e

23°C. Os mesmos autores ainda verificaram que em pêsego, cultivar ‘Okinawa’, a porcentagem de grãos de pólen germinados decresceu quando submetidos a temperaturas acima de 28°C.

Tempo de emissão do tubo polínico

Verificou-se que o início da germinação dos grãos de pólen das cultivares testados ocorreu uma hora após a inoculação (Figura 4).

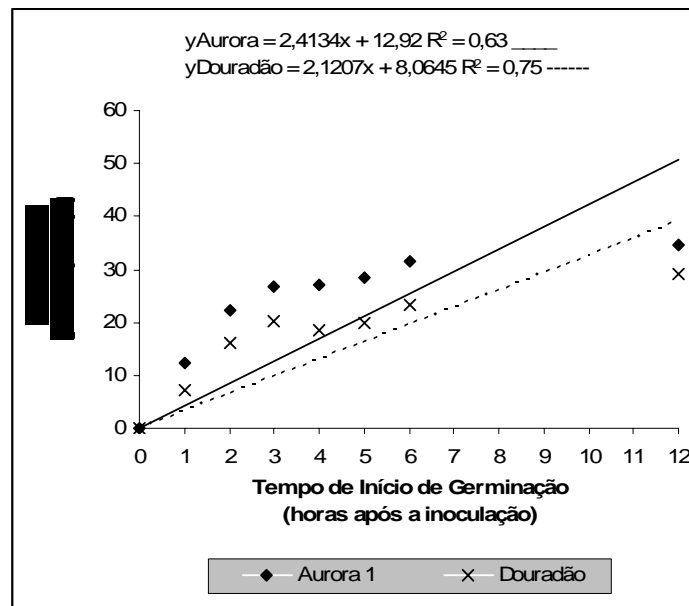


Figura 4. Porcentagem de grãos de pólen de nectarinas ‘Centenária’ e ‘Colombina’ e pessegueiro ‘Aurora 1’ e ‘Douradão’ germinados *in vitro* em função do tempo de início de germinação.

Barbosa et al. (1990), afirmam que para pessegueiro, a germinação ocorre pouco tempo após a inoculação, por volta de 60 minutos. Observou-se também que houve um crescimento linear da porcentagem de germinação à medida que se avançou no período de avaliação. Após 12 horas da inoculação, constatou-se uma porcentagem de 34,75 e 49,75% para as cultivares Douradão e Aurora 1 (Figura 4). Esses dados estão de acordo com diversos trabalhos realizados com o gênero *Prunus*. DU et al. (2006), também observaram que a germinação e o crescimento de grãos de pólen de três cultivares de umezeiro também ocorreram por volta de 0 e 12 horas após a inoculação.

CONCLUSÕES

Para a cultivar Aurora 1, maior germinação de grãos de pólen foi obtido com a utilização de $48,29 \text{ g.L}^{-1}$ de sacarose, 10 g.L^{-1} de agar, 400 mg.L^{-1} de ácido bórico e pH de 5,5.

Para a cultivar Douradão, maior germinação de grão de pólen foi obtido em meio contendo 90 g.L^{-1} para ‘Douradão’, 10 g.L^{-1} de agar, 400 mg.L^{-1} de ácido bórico, 369 mg.L^{-1} de nitrato de cálcio no meio de cultura e pH 6,5.

A melhor temperatura para germinação de grãos de pólen para as cultivares Aurora 1 e Douradão foi 25°C , sendo que a porcentagem de germinação de grãos de pólen aumentou diretamente proporcional ao tempo de avaliação.

ABSTRACT: The objective was to adjust a protocol for peach pollen grains *in vitro* germination. For that, were realized five experiments with the purpose of establish the ideal concentration of sucrose, agar, calcium nitrate, boric acid, the best pH value, the germination temperature and the polinic tube emission time. As vegetal material, was used the Aurora 1 and Douradão cultivars. For the Aurora 1 cultivar, higher germination of pollen grains was obtained with the use of $48,29 \text{ g.L}^{-1}$ of sucrose, 10 g.L^{-1} of agar, 400 mg.L^{-1} of boric acid and pH 5,5. For the Douradão cultivar, higher germination was obtained on medium containing 90 g.L^{-1} of sucrose, 10 g.L^{-1} of agar, 400 mg.L^{-1} of boric acid, 369 mg.L^{-1} of calcium nitrate and pH 6,5. The best temperature for the germination of the pollen grains for both cultivars was 25°C , being the pollen grains germination percentage raising proportionally directly to the evaluation time.

KEYWORDS: Palynology. Peach. Tissue culture. Culture medium. Reagents.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, W.; CAMPO-DALL'ORTO, F. A.; OJIMA, M.; SAMPAIO, V. R.; BANDEL, G. Ecofisiologia do desenvolvimento vegetativo e reprodutivo do pessegueiro em região subtropical. Campinas, Instituto Agrônômico, 1990, 37p. (Documentos IAC, 17).
- BARBOSA, W.; DALL'ORTO, F. A. C.; OJIMA, M.; MARTINS, F. G.; SANTOS, R. R.; SABINO, J. C. Polinização das frutíferas de caroço, ameixeira, nectarineira e pessegueiro. **O Agrônômico**, Campinas, v. 43, n. 1, p. 3-13. 1991.
- CAVALLARI, L. L.; PIO, L. A. S.; CHAGAS, E. A.; PASQUAL, M. Germinação de grãos de pólen de nêspira utilizando nitrato de cálcio e ácido bórico em diferentes níveis de pH. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUANDOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, 15., 2006, Lavras. **Anais...** Lavras:UFLA, 2006. CD-ROM.
- CHAGAS, E. A.; PIO, R.; BARBOSA, W.; SAITO, A.; CHAGAS, P. C.; MENDONCA, V.; SIGNORINI, G. Schiavinato, Y. O. Ajuste da concentração de agar e sacarose para germinação *in vitro* de grãos de pólen de nectarina. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUANDOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, 15., 2006a, Lavras. **Anais...** Lavras:UFLA, CD-ROM.
- CHAGAS, E. A.; BARBOSA, W.; PIO, R.; SAITO, A.; CHAGAS, P.C. *In vitro* germination of *Pyrus calleryana* Decne. pollen: adjusting a protocol. In: Internacional Pear Symposium, 10., 2007. Peniche. **Anais...** Peniche: ISHS, 2007. p.48.
- CHAGAS, P. C.; CHAGAS, E. A.; PIO, R.; BARBOSA, W.; CAMPO DALL'ORTO, F. A.; SAITO, A.; CAVALLARI, L. L.; MENDONCA, V. Avaliação do pH para germinação *in vitro* de grãos de pólen nectarina In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUANDOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, 15., 2006b, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, CD-ROM.
- DU, Y.; ZHANG, S.; J., X.; WU, J. Characteristics of pollen germination and pollen tube growth of *Prunus mume in vitro*. **Acta Botanica Boreali Occidentalia Sinica**, Beijing, v. 26, n. 9, p. 1846-1852, 2006.
- EINHARDT, P. M.; CORREA, E. R.; RASEIRA, M. C. B. Comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 5-7, 2006.
- FERREIRA, D.F. Análise estatística por meio do SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.
- FREITAS, D. A. F.; CHAGAS, E. A.; PIO, R.; BARBOSA, W.; SAITO, A.; NETO, J. E. B.; MENDONCA, V.; CHAGAS, P. C. Germinação de grãos de pólen de pereira sob diferentes concentrações de nitrato de cálcio e ácido bórico do meio de cultura. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUANDOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, 15., 2006, Lavras. **Anais...** Lavras:UFLA, 2006a. CD-ROM.
- FREITAS, D. A. F.; CHAGAS, E. A.; PIO, R.; BARBOSA, W.; SAITO, A.; CAMPO DALL'ORTO, F. A.; MENDONCA, V.; NETO, J. E. B.; TIZATO, L. H. G. Avaliação da germinação *in vitro* de grãos de pólen de *Pyrus calleryana* Dcne. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUANDOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, 15., 2006, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2006b. CD-ROM.
- GALLETA, G. J. Pollen and seed management. In: MOORE, J.N.; JANICK, J. **Methods in fruits breeding**, Indiana: Purdue University press. p. 23-47, 1983.
- HE, X.; ZHAO, Z. ZHOU, K.; WU, F.; XU, W. LIU, H. Comparison of pollen viability determination among 17 ornamental trees of *Prunus*. **Journal of Nanjing Forestry University Natural Science**, Nanjing, v. 29, n. 2, p. 29-32, 2005.

KWACK, B. H.; BREWBAKER, J. L. The essential role of calcium ion pollen germination and pollen tube growth. *American Journal Botany*, v. 50, p. 859-865, 1963.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 25, p. 135-166, 1974.

NUNES, J. C. de O.; DANTAS, A. C. de M.; PEDROTTI, E. L.; ORTH, A. I.; GUERRA, M. P. Germinação de pólen *in vitro* e receptividade do estigma em macieira cvs. Fuji e Golden Delicious. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 01, p. 35-39, 2001.

PASQUAL, M.; FINOTTI, D. R.; DUTRA, L. F.; CHAGAS, E. A.; RIBEIRO, L. de O. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerineira 'Poncã' em função do pH e da concentração de ágar. **Revista Brasileira de Agrobiologia**, v. 8, n. 3, p. 199-20, 2002.

PIERIK, R. L. M. ***In vitro* culture of higher plants**. Dordrecht: Martinus Nyjhoff, 344p. 1987.

PIO, L. A. S. **Viabilidade do pólen de citrso em diferentes condições de armazenamento** Lavras:UFLA, 45p. (Dissertação de mestrado em Fitotecnia – Universidade Federal de Lavras). 2003.

SAHAR, N.; SPIEGEL-ROY, P. Citrus pollen storage. *Hort Science, St. Joseph*, v. 15, n. 1, p. 81-82, 1980.

SCORZA, R.; SHERMAN, W. B. Peaches. p. 325-440. In: JANIK, J.; MOORE, J.N. (Ed.). *Fruit breeding*. New York. 1995.

STANLEY, R.G.; LINSKENS, H. F. **Pollen: biology, biochemistry and management**. New York: Springer – Verlag, 1974, 172p.

WEINBAUM, S. A.; PARFITT, D. E.; POLITO, V. S. Differential cold sensitivity of pollen grain germination in two *Prunus* species. **Euphytica**, Dordrecht, v. 33, p. 419-426, 1984.